

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PRIORITY
DOCUMENTSUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

REC'D 01 JUL 1999
WIPO PCT

EP99/3141

Bescheinigung

Die Hoechst Schering AgrEvo GmbH in Berlin/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Nucleinsäuremoleküle codierend Enzyme aus Weizen, die an der
Stärkesynthese beteiligt sind"

am 8. Mai 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole C 12 N, C 07 H und A 01 H der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 29. April 1999

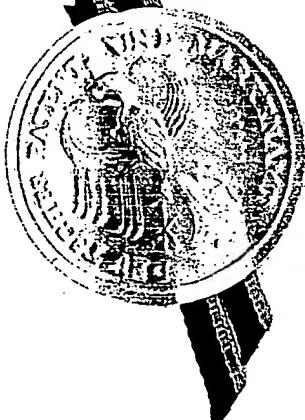
Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Joost

Aktenzeichen: 198 20 608.9



Nucleinsäuremoleküle codierend Enzyme aus Weizen, die an der Stärkesyntthese beteiligt sind

Die vorliegende Erfindung betrifft Nucleinsäuremoleküle, die ein Enzym aus Weizen codieren, das an der Stärkesyntthese in Pflanzen beteiligt ist. Bei diesem Enzym handelt es sich um eine Isoamylase.

Weiterhin betrifft diese Erfindung Vektoren, Wirtszellen, sowie Pflanzenzellen und Pflanzen, die die erfndungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen enthalten.

Zerner werden Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzen beschrieben, die aufgrund der Einführung von erfndungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen eine in ihren Eigenschaften veränderte Stärke synthetisieren.

Um Hinblick auf die zunehmende Bedeutung, die pflanzlichen Inhaltsstoffen als erneuerbaren Rohstoffquellen in letzter Zeit beigemessen wird, ist es eine der Aufgaben der biotechnologischen Forschung, sich um eine Anpassung dieser finanziellen Rohstoffe an die Anforderungen der verarbeitenden Industrie zu bemühen. Um eine Anwendung von nachwachsenden Rohstoffen in möglichst vielen Einsatzgebieten zu ermöglichen, ist es darüber hinaus erforderlich, eine große Stoffvielfalt zu erreichen.

Leben Ölen, Fetten und Proteinen stellen Polysaccharide die wesentlichen nachwachsenden Rohstoffe aus Pflanzen dar. Eine zentrale Stellung bei den Polysacchariden nimmt neben Cellulose die Stärke ein, die einer der wichtigsten Speicherstoffe in höherem Pflanzen ist. Hierbei ist Weizen eine der wichtigsten Kulturpflanzen, da ca. 20 % der Gesamtstärkeproduktion der Europäischen Gemeinschaft aus ihr gewonnen werden.

Das Polysaccharid Stärke ist ein Polymer aus chemisch einheitlichen

Grundbausteinen, den Glucosemolekülen. Es handelt sich dabei jedoch um ein sehr komplexes Gemisch aus unterschiedlichen Molekülformen, die sich hinsichtlich ihres Polymerisationsgrades des Auftretens von Verzweigungen der Glucoseketten und deren Kettenlängen unterscheiden, die darüber hinaus derivatisiert, z.B.

5 Man unterscheidet insbesondere die Amylose-Stärke, ein im wesentlichen unverzweigtes Polymer aus α -1,4-glycosidisch verknüpften Glucosemolekülen, von der Amylopektin-Stärke, die ihrerseits ein komplexes Gemisch aus unterschiedlich verzweigten Glucoseketten darstellt. Die Verzweigungen kommen dabei durch das

10 Auftreten von zusätzlichen α -1,6-glycosidischen Verknüpfungen zustande. In Weizen besteht die synthetisierte Stärke zu ca. 11 bis 37 % aus Amylose-Stärke.

Um eine möglichst vielfältige Anwendung von geeigneten Stärken für unterschiedlichste industrielle Bedürfnisse zu ermöglichen, ist es wünschenswert, Pflanzen zur Verfügung zu stellen, die in der Lage sind, modifizierte Stärken zu synthetisieren, die für verschiedene Verwendungszwecke besonders gut geeignet sind. Eine Möglichkeit, derartige Pflanzen bereitzustellen, besteht in züchterischen Maßnahmen. Die züchterischen Einflussnahme erweist sich beim Weizen aufgrund seines polyploiden Charakters (tetra- und hexaploid) jedoch sehr schwer. Erst 20 kürzlich gelang durch Kreuzung natürlich auftretender Mutanten die Herstellung eines "waxy" (Amylose-freien) Weizens (Nakamura et al., Mol. Gen. Genet. 248 (1995), 253-259).

25 Eine Alternative zu züchterischen Verfahren besteht in der gezielten Modifikation stärkeproduzierender Pflanzen durch gentechnologische Methoden. Voraussetzung hierfür ist jedoch die Identifizierung und Charakterisierung der an der Stärkesyntthese und/oder Stärkemodifikation beteiligten Enzyme sowie die Isolierung der diese Enzyme codierenden Nucleinsäuremoleküle.

30 Die biochemischen Synthesewege, die zum Aufbau von Stärke führen, sind im



wesentlichen bekannt. Die Stärkesynthese in pflanzlichen Zellen findet in den Plastiden statt. In photosynthetisch aktiven Geweben sind dies die Chloroplasten, in photosynthetisch inaktiven, stärkespeichernden Geweben die Amyloplasten.

Für eine weitere gezielte Veränderung des Verzweigungsgrades von in Pflanzen synthetisierter Stärke mit Hilfe gentechnischer Verfahren ist es nach wie vor erforderlich, DNA-Sequenzen zu identifizieren, die Enzyme codieren, die am Stärkemetabolismus, insbesondere an der Einführung oder am Abbau von Verzweigungen innerhalb der Stärkemoleküle, beteiligt sind.

Neben den sog. Q-Enzymen, die Verzweigungen in Stärkemoleküle einführen, kommen in Pflanzen Enzyme vor, die Verzweigungen auflösen können. Diese Enzyme werden als Debranching-Enzyme bezeichnet und werden entsprechend ihrer Substratspezifität in drei Gruppen eingeteilt:

- Die Pullulanase, die neben Pullulan auch Amylopektin als Substrat nutzen, kommen in Mikroorganismen, z.B. *Klebsiella*, und in Pflanzen vor. In Pflanzen werden diese Enzyme auch als R-Enzyme bezeichnet.
- Die Isoamylasen, die nicht Pullulan, wohl aber Glycogen und Amylopektin als Substrat nutzen, kommen ebenfalls in Mikroorganismen und Pflanzen vor. Isoamylasen wurden beispielsweise in Mais (Manners & Carbohydr. Res. 9 (1969), 107) und Kartoffel (Ishizaki et al., Agric. Biol. Chem. 47 (1983), 771-779) beschrieben.
- Die Amylo-1,6-Glucosidasen sind in Säugern und Hefen beschrieben und nutzen Grenzdextrine als Substrat.

n Zuckerrüben konnte von Li et al. (Plant Physiol. 98 (1992), 1277-1284) eben fünf Endo- und zwei Exoamylasen nur ein Debranching-Enzym vom 100 kD und ein pH-Optimum von 5,5 aufweist, ist in den Chloroplasten lokalisiert. Auch für Spinat wurde ein Debranching-Enzym beschrieben, das Pullulan als Substrat verwendet. Sowohl das Debranching-Enzym aus Spinat als auch das aus der Zuckerrübe besitzen bei der Reaktion mit Amylopektin als Substrat verglichen mit Pullulan als Substrat, eine 5-fach geringere Aktivität (Ludwig et al., Plant Physiol. 74 (1984), 856-861; Li et al., Plant Physiol. 98 (1992), 1277-1284).

Bei der landwirtschaftlich wichtigen stärkespeichernden Kulturpflanze Kartoffel wurde die Aktivität eines Debranching-Enzyms von Hobson et al. (J. Chem. Soc., (1951), 1451) untersucht. Es gelang der Nachweis, daß das entsprechende Enzym im Gegensatz zum Q-Enzym keine kettenverlängernde Aktivität besitzt, sondern lediglich α -1,6-glycosidische Bindungen hydrolysiert.

Das Enzym konnte jedoch bisher nicht genauer charakterisiert werden. Im Fall der Kartoffel wurden bereits Verfahren zur Reinigung des Debranching-Enzyms sowie partielle Peptidsequenzen des gereinigten Proteins vorgeschlagen (WO 95/04826). Für Spinat wurde inzwischen die Reinigung eines Debranching-Enzyms, sowie die Isolierung einer entsprechenden cDNA beschrieben (Renz et al., Plant Physiol. 108 (1995), 1342).

Für Mais wurde bisher in der Literatur lediglich die Existenz eines Debranching-Enzyms beschrieben. Dieses wird aufgrund seiner Substratspezifität in die Gruppe der Isoamylasen eingeordnet (siehe z.B. Hannah et al., Scientia Horticulturae 55 (1993), 177-197 oder Garwood (1984) in Starch Chemistry and Technology, Whistler, R.L., BeMiller, J.N., Puschall, E.F. (eds.), Academic Press San Diego, New York, Boston, 25-86). Die entsprechende Mutante wird als *s(sugary)* bezeichnet. Das Gen des *sugary*-Locus wurde kürzlich clontiert (siehe James et al., Plant Cell 7 (1995), 417-429). Neben dem *sugary*-Locus ist bisher in Mais kein anderer Genlocus bekannt, der ein Protein mit Debranching-Enzymaktivität codiert. Es gab bisher auch keinerlei Hinweise, daß andere Debranching-Enzymformen in Mais vorkommen. Will man transgene Maispflanzen herstellen, die keinerlei Debranching-Enzymaktivitäten mehr aufweisen, z.B. um eine Verlängerung des Verzweigungsgrades der

15 Amylopektinstärke zu erzielen, so ist es erforderlich, alle in Mais vorkommenden

Debranching-Enzymformen zu identifizieren und die entsprechenden Gene oder cDNA-Sequenzen zu isolieren.



5

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung Nucleinsäuremoleküle, die mit einem der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle hybridisieren.



5

Gegenstand der Erfindung sind ebenfalls Nucleinsäuremoleküle, die eine Isoamylase aus Weizen codieren und deren Sequenz aufgrund der Degeneration des genetischen Codes von den Nucleotidsequenzen der oben beschriebenen Moleküle abweicht.

10

Um weitere Möglichkeiten bereitzustellen, beliebige stärke-speichernde Pflanzen, vorzugsweise Getreide, insbesondere Weizen, dahingehend zu verändern, daß sie eine modifizierte Stärke synthetisieren, ist es erforderlich, jeweils DNA-Sequenzen zu identifizieren, die weitere Isoformen von Verzweigungsenzymen codieren.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde,

15

Nucleinsäuremoleküle zur Verfügung zu stellen, die an der Stärkebiosynthese beteiligte Enzyme codieren und mit deren Hilfe es möglich ist, gentechnisch modifizierte Pflanzen herzustellen, die die Herstellung von in ihren chemischen und/oder physikalischen Eigenschaften veränderten pflanzlichen Stärken ermöglichen.

20

Diese Aufgabe wird durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen bezeichneten Ausführungsformen gelöst.

20 Besonders bevorzugt erfolgt eine "Hybridisierung", unter den folgenden Bedingungen:

Hybridisierungspuffer: 2 x SSC; 10 x Denhardt-Lösung (Fikoll 400 + PEG + BSA, Verhältnis 1:1:1); 0,1% SDS, 5 mM EDTA; 50 mM Na₂HPO₄; 250 µg/ml Heringssperma-DNA; 50 µg/ml tRNA, oder

25 Funktion einer Isoamylase aus Weizen, wobei derartige Moleküle vorzugsweise Proteine codieren, die im wesentlichen die unter Seq ID No. 3 angegebene Aminosäuresequenz umfassen, insbesondere betrifft die Erfindung Nucleinsäuremoleküle, die die unter Seq ID No. 1 angegebene Nucleotidsequenz oder einen Teil davon, bevorzugt Moleküle, die die in Seq ID No. 1 angegebene codierende Region sowie entsprechende (korrespondierende) Ribonucleotidsequenzen enthalten.

30

Hybridisierungstemperatur T = 65 bis 68°C
Waschpuffer: 0.2 x SSC; 0.1% SDS



verstanden, die lang genug sind, um eines der beschriebenen Proteine zu codieren.

Der Ausdruck **Derivat** bedeutet in diesem Zusammenhang, daß die Sequenzen dieser Moleküle sich von den Sequenzen der oben beschriebenen Nucleinsäuremoleküle an einer oder mehreren Positionen unterscheiden und einen hohen Grad an

Homologie zu diesen Sequenzen aufweisen. Homologie bedeutet dabei eine Sequenzidentität von mindestens 40 %, insbesondere eine Identität von mindestens 60 %, vorzugsweise über 80 % und besonders bevorzugt über 90 %. Die Abweichungen zu den oben beschriebenen Nucleinsäuremolekülen können dabei durch Deletion, Substitution, Insertion oder Rekombination entstanden sein.

Die Identifizierung und Isolierung derartiger Nucleinsäuremoleküle kann dabei unter

Verwendung der erfindungsgemäßen Moleküle oder Teile dieser Moleküle bzw. der eversen Komplemente dieser Moleküle erfolgen, z.B. mittels Hybridisierung nach Standardverfahren (siehe z.B. Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A laboratory Manual, 2. Aufl, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

Als Hybridisierungsprobe können z.B. Nucleinsäuremoleküle verwendet werden, die exakt die oder im wesentlichen die unter Seq ID No. 1 angegebene Nucleotidsequenz oder Teile dieser Sequenz aufweisen. Bei den als Hybridisierungsprobe verwendeten Fragmenten kann es sich auch um synthetische Fragmente handeln, die mit Hilfe der gängigen Synthesetechniken hergestellt wurden und deren Sequenz im wesentlichen mit der eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls übereinstimmt.

Die Identifizierung und Isolierung derartiger Nucleinsäuremoleküle, die mit den erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen hybridisieren, können prinzipiell Isoamylasen aus jeder beliebigen Weizenpflanze codieren, die derartige Proteine exprimiert.

Nucleinsäuremoleküle, die mit den erfindungsgemäßen Molekülen hybridisieren, können z.B. aus genomischen oder aus cDNA-Bibliotheken von Weizen oder Weizenpflanzengewebe isoliert werden. Alternativ können sie durch gentechnische Methoden oder durch chemische Synthese hergestellt werden.

Homologie bedeutet ferner, daß funktionelle und/oder strukturelle Äquivalenz zwischen den betreffenden Nucleinsäuremolekülen oder den durch sie codierten Proteinen, besteht. Bei den Nucleinsäuremolekülen, die homolog zu den oben beschriebenen Molekülen sind und Derivate dieser Moleküle darstellen, handelt es sich in der Regel um Variationen dieser Moleküle, die Modifikationen darstellen, die dieselbe biologische Funktion ausüben. Es kann sich dabei sowohl um natürlicherweise auftretende Variationen handeln, beispielsweise um Sequenzen aus anderen Organismen, oder um Mutationen, wobei diese Mutationen auf natürliche Weise aufgetreten sein können oder durch gezielte Mutagenese eingeführt wurden. Ferner kann es sich bei den Variationen um synthetisch hergestellte Sequenzen handeln. Bei den allelischen Varianten kann es sich sowohl um natürlich auftretende Varianten handeln, als auch um synthetisch hergestellte oder durch rekombinante DNA-Techniken erzeugte Varianten.

Die von den verschiedenen Varianten der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle codierten Isoamylasen weisen bestimmte gemeinsame Charakteristika auf. Dazu können z.B. Enzymaktivität, Molekulargewicht, immunologische Reaktivität, Konformation etc. gehören, sowie physikalische Eigenschaften wie z.B. das Laufverhalten in Gelektrophoresen, chromatographisches Verhalten, Sedimentationskoeffizienten, Löslichkeit,

spektroskopische Eigenschaften, Ladungseigenschaften, Stabilität; pH-Optimum, Temperatur-Optimum etc.

5 Bei dem durch die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle codierten Protein handelt es sich um eine Isoamylase aus Weizen. Diese Proteine weisen gewisse Homologiebereiche zu bisher bekannten Isoamylasen aus anderen Pflanzenarten auf.

10 Bei den erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen kann es sich um DNA- Moleküle handeln, insbesondere um cDNA- oder genormische Moleküle. Ferner können die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle RNA-Moleküle sein. Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle können z. B. aus natürlichen Quellen gewonnen sein, oder durch rekombinante Techniken oder synthetisch hergestellt 15 sein.

Gegenstand der Erfindung sind auch Oligonukleotide, die spezifisch mit einem erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekül hybridisieren. Derartige Oligonukleotide haben vorzugsweise eine Länge von mindestens 10, insbesondere von mindestens 20 15 und besonders bevorzugt von mindestens 50 Nukleotiden. Die erfindungsgemäßen Oligonukleotide sind dadurch gekennzeichnet, daß sie spezifisch mit erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen hybridisieren, d.h. nicht oder nur in sehr geringem Ausmaß mit Nucleinsäuresequenzen, die andere Proteine, insbesondere andere Isoamylasen codieren. Die erfindungsgemäßen Oligonukleotide können beispielsweise als Primer für eine PCR-Reaktion verwendet werden oder als Hybridisierungsprobe für die Isolierung verwandter Gene. Ebenso können sie Bestandteile von antisense-Konstrukten sein oder von DNA-Molekülen, die für geeignete Ribozyme codieren.

Ferner betrifft die Erfindung Vektoren, insbesondere Plasmide, Cosmide, Viren, Bacteriophagen und andere in der Genteknik gängige Vektoren, die die oben beschriebenen erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle enthalten. Derartige Vektoren sind zur Transformation pro- oder eukaryontischer, vorzugsweise pflanzlicher Zellen geeignet.

10 Vorzugsweise besonders bevorzugt erlauben sie die Integration der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle, gegebenenfalls zusammen mit flankierenden regulatorischen Regionen, in das Genom der Pflanzenzelle. Beispiele hierfür sind binäre Vektoren, die bei dem Agrobakterien-vermittelten Gentransfer eingesetzt werden können.

Der Begriff "Vektor" bezeichnet im allgemeinen ein geeignetes, dem Fachmann bekanntes Hilfsmittel, das den gezielten Transfer eines ein- oder doppelsträngigen Nucleinsäuremoleküls in eine Wirtszelle ermöglicht, beispielsweise einen DNA- oder RNA-Virus, ein Virusfragment, ein Plasmidkonstrukt, das in An- oder Abwesenheit von regulatorischen Elementen zum Nucleinsäure-Transfer in Zellen geeignet sein kann, Trägermaterialien wie Glasfaser oder auch Metallpartikel wie sie z.B. beim "particle gun"-Verfahren eingesetzt werden können, er kann aber auch ein Nucleinsäuremolekül umfassen, das durch chemische oder physikalische Verfahren direkt in eine Zelle gebracht werden kann.

In einer bevorzugten Ausführungsform sind die in den Vektoren enthaltenen Nucleinsäuremoleküle verknüpft mit regulatorischen Elementen, die die Transkription und Synthese einer translatierbaren RNA in pro- oder eukaryontischen Zellen gewährleisten.

25 Die Expression der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle in prokaryontischen Zellen, beispielsweise in *Escherichia coli*, ist insofern interessant, als daß auf diese



weise eine genauere Charakterisierung der enzymatischen Aktivitäten der Enzyme, Jr die diese Moleküle codieren, ermöglicht wird. Es ist insbesondere möglich, das Produkt, das von den entsprechenden Enzymen in Abwesenheit anderer, in der pflanzlichen Zelle an der Stärkesynthese beteiligter Enzyme synthetisiert wird, zu charakterisieren. Dies lässt Rückschlüsse zu auf die Funktion, die das entsprechende Protein bei der Stärkesynthese in der Pflanzenzelle ausübt.

darüber hinaus ist es möglich, mittels gängiger molekulärbiologischer Techniken (siehe z.B. Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Aufl. Old Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) verschiedenartige Mutationen in die erfundungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle einzuführen, wodurch s zur Synthese von Proteinen mit eventuell veränderten biologischen Eigenschaften kommt. Hierbei ist zum einen die Erzeugung von Deletionsmutationen möglich, bei denen durch fortschreitende Deletionsen vom 5'- oder vom 3'-Ende der dierenden DNA-Sequenz Nucleinsäuremoleküle erzeugt werden, die zur Synthese entsprechend verkürzter Proteine führen. Durch derartige Deletionsen am Ende der Nucleotidsequenz ist es beispielweise möglich, Aminosäuresequenzen i identifizieren, die für die Translokation des Enzyms in die Plastidenantwortlich sind (Transpeptid). Dies erlaubt es, gezielt Enzyme herzustellen, e durch Entfernen der entsprechenden Sequenzen nicht mehr in den Plastiden, andern im Cytosol lokalisiert sind, oder aufgrund der Addition von anderen Sialsequenzen in anderen Kompartimenten lokalisiert sind.

ndererseits ist auch die Einführung von Punktmutationen denkbar an Positionen, in denen eine Veränderung der Aminosäuresequenz einen Einfluss beispielweise auf die Enzymaktivität oder die Regulierung des Enzyms hat. Auf diese Weise können z.B. Mutanten hergestellt werden, die einen veränderten K_m -Wert besitzen (er nicht mehr den normalenweise in der Zelle vorliegenden Regulationsmechanismen über allosterische Regulation oder kovalente Modifizierung unterliegen.

Des Weiteren können Mutanten hergestellt werden, die eine veränderte Substrat- oder Produktspezifität aufweisen. Weiterhin können Mutanten hergestellt werden, die ein verändertes Aktivitäts-Temperatur-Profil aufweisen.

5 Für die gentechnische Modifikation prokaryontischer Zellen können die erfundungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle oder Teile dieser Moleküle in Plasmide eingebracht werden, die eine Mutagenese oder eine Sequenzveränderung durch Rekombination von DNA-Sequenzen erlauben. Mit Hilfe von Standardverfahren (vgl. Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A laboratory manual, 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA) können Basenaustausche vorgenommen oder

10 natürliche oder synthetische Sequenzen hinzugefügt werden. Für die Verbindung der DNA-Fragmente untereinander können an die Fragmente Adaptores oder Linker angesetzt werden. Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionschnittstellen zur Verfügung stellen oder die überflüssige DNA oder 15 Restriktionschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen in Frage kommen, können in vitro-Mutagenese, "primer repair", Restriktion oder Ligation verwendet werden. Als Analysemethode werden im allgemeinen Sequenzanalyse, Restriktionsanalyse oder weitere biochemisch-molekulärbiologische Methoden durchgeführt.

20

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung Wirtszellen, insbesondere pro- oder eukaryontische Zellen, die mit einem oben beschriebenen erfundungsgemäßen Nucleinsäuremolekül oder einem erfundungsgemäßen Vektor transformiert sind, sowie Zellen, die von derart transformierten Zellen abstammen und ein erfundungsgemäßes Nucleinsäuremolekül oder einen Vektor enthalten. Dabei handelt es sich vorzugsweise um pro- oder eukaryontische, insbesondere um pflanzliche Zellen.

25 Gegenstand der Erfindung sind ferner rekombinant herstellbare Proteine mit der Aktivität einer Isoamylase, die durch die erfundungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle



codiert werden, sowie Verfahren zu deren Herstellung, worin eine erfindungsgemäße Wirtszelle unter dem Fachmann bekannten, geeigneten Bedingungen kultiviert wird, die die Synthese des erfindungsgemäßen Proteins erlauben, und es anschließend aus den Wirtszellen und/oder dem Kulturmedium isoliert wird.

5

Durch die Bereitstellung der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle ist es nun möglich, mit Hilfe gentechnischer Methoden in den Stärkemetabolismus von Pflanzen gezielt einzugreifen und ihn dahingehend zu verändern, daß es zur Synthese einer modifizierten Stärke kommt, die in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften, beispielsweise dem Amylose/Amylopektin-Verhältnis, dem Verzweigungsgrad, der durchschnittlichen Kettenlänge, dem Phosphatgehalt, dem Verkleisterungsverhalten, den Gel- oder Filmbildungseigenschaften, der Stärkekorngröße und/oder der Stärkekornform im Vergleich zu bekannter Stärke verändert ist.

5

Möglich ist somit die Expression der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle in pflanzlichen Zellen, um die Aktivität der entsprechenden Isoamylase zu erhöhen, oder die Einführung in Zellen, die dieses Enzym natürlicherweise nicht exprimieren. Ferner ist es möglich, die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle nach dem Fachmann bekannten Methoden zu modifizieren, um erfindungsgemäße Isoamylasen zu erhalten, die nicht mehr den natürlichen zelleigenen Regulationsmechanismen unterliegen; bzw. veränderte Temperatur-Aktivitätsprofile oder Substrat- bzw. Produktspezifitäten aufweisen.

5

Bei der Expression der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle in Pflanzen besteht grundsätzlich die Möglichkeit, daß das synthetisierte Protein in jedem beliebigen Kompartiment der pflanzlichen Zelle lokalisiert sein kann. Um die Lokalisation in einem bestimmten Kompartiment zu erreichen, muß die Lokalisation in Plastiden gewährleistende Sequenz deletiert werden und die verbleibende codierende Region gegebenenfalls mit DNA-Sequenzen verknüpft werden, die die Lokalisierung in dem jeweiligen Kompartiment gewährleisten.

Derartige Sequenzen sind bekannt (siehe beispielsweise Braun et al., EMBO J. 11 (1992), 3219-3227; Wolter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988), 846-850; Sonnewald et al., Plant J. 1 (1991), 95-106).

5

Die vorliegende Erfindung betrifft somit auch transgene Pflanzenzellen, die mit einem erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekül oder Vektor transformiert wurden, sowie transgene Pflanzenzellen, die von derartig transformierten Zellen abstammen. Derartige Zellen enthalten ein oder mehrere erfindungsgemäße Nucleinsäuremoleküle, wobei diese vorzugsweise mit regulatorischen DNA-Elementen verknüpft sind, die die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleisten, insbesondere mit einem geeigneten Promotor. Derartige Zellen lassen sich von natürlicherweise vorkommenden Pflanzenzellen unter anderem dadurch unterscheiden, daß sie ein erfindungsgemäses Nucleinsäuremolekül enthalten, das natürlicherweise in diesen Zellen nicht vorkommt oder dadurch, daß ein solches Molekül an einem Ort im Genom der Zelle integriert vorliegt, an dem es sonst nicht vorkommt, d. h. in einer anderen genetischen Umgebung. Ferner lassen sich derartige erfindungsgemäße transgene Pflanzenzellen von natürlicherweise vorkommenden Pflanzenzellen dadurch unterscheiden, daß sie mindestens eine Kopie eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls stabil integriert in ihr Genom enthalten, gegebenenfalls zusätzlich zu natürlicherweise in den Zellen vorkommenden Kopien eines solchen Moleküls. Handelt es sich bei dem (den) in die Zellen eingeführten Nucleinsäuremolekül(en) um zusätzliche Kopien zu bereits natürlicherweise in den Zellen vorkommenden Molekülen, so lassen sich die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen von natürlicherweise vorkommenden insbesondere dadurch unterscheiden, daß diese zusätzliche(n) Kopie(n) an Orten im Genom lokalisiert ist(sind) an denen sie natürlicherweise nicht vorkommt(vorkommen). Dies läßt sich beispielsweise mit Hilfe einer Southern Blot-Analyse nach dem Fachmann bekannten Verfahren einfach überprüfen.

25

Ist das in das pflanzliche Genom eingeführte erfindungsgemäße

Kleistern dieser Stärke im Vergleich zu bekannten Stärken verändert sein.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ferner eine Stärke, die aus den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen, Pflanzen sowie deren Vermehrungsmaterial erhältlich ist und Stärke, die durch das oben beschriebene erfindungsgemäße Verfahren erhältlich ist.

Ferner ist es möglich, mit Hilfe der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle Pflanzenzellen und Pflanzen zu erzeugen, bei denen die Aktivität eines erfindungsgemäßen Proteins verringert ist. Dies führt ebenfalls zur Synthese einer Stärke mit veränderten chemischen und/oder physikalischen Eigenschaften verglichen mit Stärke aus Wildtyp-Pflanzenzellen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist somit auch ein transgene Pflanzenzelle, enthaltend ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül, in der die Aktivität einer Isoamylase im Vergleich zu nicht-transformierten Zellen reduziert ist.

Die Herstellung von Pflanzenzellen mit einer verringerten Aktivität einer Isoamylase kann beispielsweise erzielt werden durch die Expression einer entsprechenden antisense-RNA, einer sense-RNA zur Erzielung eines Cosuppressionseffektes oder die Expression eines entsprechend konstruierten Ribozyme, das spezifisch Transkripte spaltet, die eine Isoamylase codieren, unter Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle nach dem Fachmann bekannten Verfahren, vgl. Jorgensen (Trends Biotechnol. 8 (1990), 340-344), Niebel et al., (Curr. Top. Microbiol. Immunol. 197 (1995), 91-103), Flavell et al. (Curr. Top. Microbiol. Immunol. 197 (1995), 43-46), Palaqui und Vaucheret (Plant. Mol. Biol. 29 (1995), 149-159), Vaucheret et al., (Mol. Gen. Genet. 248 (1995), 311-317), de Borne et al. (Mol. Gen. Genet. 243 (1994), 613-621).

i) Vorzugsweise wird zur Reduzierung der Aktivität einer erfindungsgemäßen Isoamylase in den pflanzlichen Zellen die Anzahl der sie codierenden Transkripte

reduziert, z.B. durch Expression einer antisense-RNA.

Hierzu kann zum einen ein DNA-Molekül verwendet werden, das die gesamte für ein erfindungsgemäßes Protein codierende Sequenz einschließlich eventuell vorhandener flankierender Sequenzen umfaßt, als auch DNA-Moleküle, die nur Teile der codierenden Sequenz umfassen, wobei diese Teile lang genug sein müssen, um in den Zellen einen antisense-Effekt zu bewirken. Es können im allgemeinen Sequenzen bis zu einer Mindestlänge von 15 bp, vorzugsweise einer Länge von 100-500 bp, für eine effiziente antisense-Inhibition insbesondere Sequenzen mit einer Länge über 500 bp verwendet werden. In der Regel werden DNA-Moleküle verwendet, die kürzer als 5000 bp, vorzugsweise Sequenzen, die kürzer als 2500 bp sind.

Möglich ist auch die Verwendung von DNA-Sequenzen, die einen hohen Grad an Homologie zu den Sequenzen der erfindungsgemäßes DNA-Moleküle aufweisen, aber nicht vollkommen identisch sind. Die minimale Homologie sollte größer als ca. 65 % sein. Die Verwendung von Sequenzen mit Homologien zwischen 95 und 100 % ist zu bevorzugen.

20 Gegenstand der Erfindung ist auch ein Verfahren zur Herstellung einer modifizierten Stärke umfassend den Schritt der Extraktion der Stärke aus einer erfindungsgemäßes Zelle oder Pflanze und/oder aus stärkespeichernden Teilen einer solchen Pflanze.

25 Gegenstand der Erfindung ist ferner Stärke, die aus den erfindungsgemäßes Zelle, Pflanzen sowie Vermehrungsmaterial oder deren Teilen erhältlich ist sowie Stärke, die durch ein erfindungsgemäßes Verfahren erhältlich ist.

Die erfindungsgemäßes Stärken können nach dem Fachmann bekannten Verfahren modifiziert werden und eignen sich in unmodifizierter oder modifizierter Form für

verschiedene Verwendungen im Nahrungsmittel- oder Nicht-Nahrungsmittelbereich.

Grundsätzlich lassen sich die Einsatzmöglichkeiten der erfindungsgemäßen Stärken in zwei große Bereiche unterteilen. Der eine Bereich umfaßt die Hydrolyseprodukte der Stärke, hauptsächlich Glucose und Glucanbausteine, die über enzymatische oder chemische Verfahren erhalten werden. Sie dienen als Ausgangsstoff für weitere chemische Modifikationen und Prozesse, wie Fermentation. Für eine Reduktion der Kosten kann hierbei die Einfachheit und kostengünstige Ausführung eines Hydrolyseverfahrens von Bedeutung sein. Gegenwärtig verläuft es im wesentlichen enzymatisch unter Verwendung von Amyloglucosidase. Vorstellbar wäre eine Kosteneinsparung durch einen geringeren Einsatz von Enzymen. Eine Strukturveränderung der Stärke, z.B. Oberflächenvergrößerung des Korns, leichtere Verdaulichkeit durch z.B. geringerer Verzweigungsgrad oder eine sterische Struktur, die die Zugänglichkeit für die eingesetzten Enzyme begrenzt, könnte dies bewirken.

Der andere Bereich, in dem die erfindungsgemäßen Stärken wegen ihrer polymeren Struktur als sogenannte native Stärke verwendet wird, gliedert sich in zwei weitere Einsatzgebiete:

1. **Nahrungsmittelindustrie**
Stärke ist ein klassischer Zusatzstoff für viele Nahrungsmittel, bei denen sie im wesentlichen die Funktion des Bindens von wässrigen Zutatstoffen übernimmt bzw. eine Erhöhung der Viskosität oder aber eine erhöhte Gelbildung hervorruft. Wichtige Eigenschaftsmerkmale sind das Fließ- und Sорtionsverhalten, die Quell- und Verkleisterungstemperatur, die Viskosität und Dickungsleistung, die Löslichkeit der Stärke, die Transparenz und Kleisterstruktur, die Hitze-, Scher- und Säurestabilität, die Neigung zur Retrogradation, die Fähigkeit zur Filmbildung, die Gefrier-/Taufestigkeit, die Viskositätsstabilität in Salzlösungen, die Verdaulichkeit sowie die Fähigkeit

zur Komplexbildung mit z.B. anorganischen oder organischen Ionen.

2. **Nicht-Nahrungsmittelindustrie**
In diesem großen Bereich kann die Stärke als Hilfsstoff für unterschiedliche Herstellungsprozesse bzw. als Zusatzstoff in technischen Produkten eingesetzt. Bei der Verwendung der Stärke als Hilfsstoff ist hier insbesondere die Papier- und Pappelindustrie zu nennen. Die Stärke dient dabei in erster Linie zur Retardation (Zurückhaltung von Feststoffen), der Abbindung von Füllstoff- und Feinstoffteilchen, als Festigungsstoff und zur Entwässerung. Darüber hinaus werden die günstigen Eigenschaften der Stärke in bezug auf die Steifigkeit, die Härte, den Klang, den Griff, den Glanz, die Glätte, die Spaltfestigkeit sowie die Oberflächen ausgenutzt.

2.1 **Papier- und Pappelindustrie**
Innerhalb des Papierherstellungsprozesses sind vier Anwendungsbereiche, nämlich Oberfläche, Strich, Masse und Sprühen, zu unterscheiden. Die Anforderungen an die Stärke in bezug auf die Oberflächenbehandlung sind im wesentlichen ein hoher Weißgrad, eine angepaßte Viskosität, eine hohe Viskositätsstabilität, eine gute Filmbildung sowie eine geringe Staubbildung. Bei der Verwendung im Strich spielt der Feststoffgehalt, eine angepaßte Viskosität, ein hohes Bindevermögen sowie eine hohe Pigmentaffinität eine wichtige Rolle. Als Zusatz zur Masse ist eine rasche, gleichmäßige, verlustfreie Verteilung, eine hohe mechanische Stabilität und eine vollständige Zurückhaltung im Papierfließ von Bedeutung. Beim Einsatz der Stärke im Sprühbereich sind ebenfalls ein angepaßter Feststoffgehalt, hohe Viskosität sowie ein hohes Bindevermögen von Bedeutung.

2.2 **Klebstoffindustrie**
Ein großer Einsatzbereich der Stärken besteht in der Klebstoffindustrie, wo man die Einsatzmöglichkeiten in vier Teilbereiche gliedert: die Verwendung



als reinem Stärkeleim, die Verwendung bei mit speziellen Chemikalien aufbereiteten Stärkeleimen, die Verwendung von Stärke als Zusatz zu synthetischen Harzen und Polymerdispersionen sowie die Verwendung von Stärken als Streckmittel für synthetische Klebstoffe. 90 % der Klebstoffe auf

5 Stärkebasis werden in den Bereichen Wellpappenherstellung, Herstellung von Papiersäcken, Beuteln und Tüten, Herstellung von Verbundmaterialien für Papier und Aluminium, Herstellung von Kartonagen und Wiederbefeuchtungsleim für Briefumschläge, Briefmarken usw. eingesetzt.

10 2.3 Textil- und Textilpflegemittelindustrie

Ein großes Einsatzfeld für die Stärken als Hilfsmittel und Zusatzstoff ist der Bereich Herstellung von Textilien und Textilpflegemitteln. Innerhalb der Textilindustrie sind die folgenden vier Einsatzbereiche zu unterscheiden: Der Einsatz der Stärke als Schlichthilfsmittel, d.h. als Hilfsmittel zur Glättung und Stärkung des Klettverhaltens zum Schutz gegen die beim Weben angreifenden Zugkräfte sowie zur Erhöhung der Abriebfestigkeit beim Weben, Stärke als Mittel zur Textilaufrauung vor allem nach qualitätsverschlechternden Vorbehandlungen, wie Bleichen, Färben usw., Stärke als Verdickungsmittel bei der Herstellung von Farbpasten zur Verhinderung von Farbstoffdiffusionen sowie Stärke als Zusatz zu Kettungsmitteln für Nähgärne.

2.4 Baustoffindustrie

Der vierte Einsatzbereich ist die Verwendung der Stärken als Zusatz bei Baustoffen. Ein Beispiel ist die Herstellung von Gipskartonplatten, bei der die im Gipsbrei vermischt Stärke mit dem Wasser verkleistert, an die Oberfläche der Gipsplatte diffundiert und dort den Karton an die Platte bindet. Weitere Einsatzbereiche sind die Beimischung zu Putz- und Mineralfasern. Bei Transportbelag werden Stärkeprodukte zur Verzögerung der Abbindung eingesetzt.

2.5 Bodenstabilisation

Ein weiterer Markt für die Stärke bietet sich bei der Herstellung von Mitteln zur Bodenstabilisation an, die bei künstlichen Erdbewegungen zum temporären Schutz der Bodenpartikel gegenüber Wasser eingesetzt werden. Kombinationsprodukte aus der Stärke und Polymeremulsionen sind nach heutiger Kenntnis in ihrer Erosions- und Verkrustungsmindernden Wirkung den bisher eingesetzten Produkten gleichzusetzen, liegen preislich aber deutlich unter diesen.

10 2.6 Einsatz in Pflanzenschutz- und Düngemitteln

Ein Einsatzbereich liegt in der Verwendung der Stärke in Pflanzenschutzmitteln zur Veränderung der spezifischen Eigenschaften der Präparate. So kann die Stärke zur Verbesserung der Benetzung von Pflanzenschutz- und Düngemitteln, zur dosierten Freigabe der Wirkstoffe, zur Umwandlung flüssiger, flüchtiger und/oder übelriechender Wirkstoffe in mikrokristalline stabile, formbare Substanzen, zur Mischung inkompatibler Verbindungen und zur Verlängerung der Wirkdauer durch Verminderung der Zersetzung eingesetzt werden.

20 2.7 Pharmaka, Medizin und Kosmetikindustrie

Ein weiteres Einsatzgebiet besteht im Bereich der Pharmaka, Medizin und Kosmetikindustrie. In der pharmazeutischen Industrie kann die Stärke als Bindemittel für Tabletten oder zur Bindemittelverdünnung in Kapseln eingesetzt werden. Weiterhin kann die Stärke als Tablettensprengmittel dienen, da sie nach dem Schlucken Flüssigkeit absorbieren und nach kurzer Zeit soweit quellen, daß der Wirkstoff freigesetzt wird. Medizinische Gleit- und Wundpuder basieren aus qualitativen Gründen auf Stärke. Im Bereich der Kosmetik werden Stärken beispielsweise als Träger von Puderzusatzstoffen, wie Düften und Salicylsäure eingesetzt. Ein relativ großer Anwendungsbereich für die Stärke liegt bei Zahnpasta.





2.8 Stärkezusatz zu Kohlen und Briketts

Einen Einsatzbereich bietet die Stärke als Zusatzstoff zu Kohle und Brikett. Kohle kann mit einem Stärkezusatz quantitativ hochwertig agglomeriert bzw. briekettiert werden, wodurch ein frühzeitiges Zerfallen der Briketts verhindert wird. Der Stärkezusatz liegt bei Grillkohle zwischen 4 und 6 %, bei kalorierter Kohle zwischen 0,1 und 0,5 %. Des weiteren gewinnen Stärken als Bindemittel an Bedeutung, da durch ihren Zusatz zu Kohle und Brikett der Ausstoß schädlicher Stoffe deutlich vermindert werden kann.

2.9 Erz- und Kohleschlammaufbereitung

Die Stärke kann ferner bei der Erz- und Kohleschlammaufbereitung als Flockungsmittel eingesetzt werden.

2.10 Gießereihilfsstoff

Ein weiterer Einsatzbereich besteht als Zusatz zu Gießereihilfsstoffen. Bei verschiedenen Gußverfahren werden Kerne benötigt, die aus Bindemittel- versetzten Säuden hergestellt werden. Als Bindemittel wird heute überwiegend Bentonit eingesetzt, das mit modifizierten Stärken, meist Quellsäuren, versetzt ist. Zweck des Stärkezusatzes ist die Erhöhung der Fließfestigkeit sowie die Verbesserung der Bindfestigkeit. Darüber hinaus können die Quellsäuren weitere produktionstechnische Anforderungen, wie im kalten Wasser dispergierbar, rehydratisierbar, gut in Sand mischbar und hohes Wasserbindungsvermögen, aufweisen.

2.11 Einsatz in der Kautschukindustrie

In der Kautschukindustrie kann die Stärke zur Verbesserung der technischen und optischen Qualität eingesetzt werden. Gründe sind dabei die Verbesserung des Oberflächenglanzes, die Verbesserung des Griffs und des Aussehens, dafür wird Stärke vor der Kalt vulkanisation auf die klebrigen

gummierter Flächen von Kautschukstoffen gestreut, sowie die Verbesserung der Bedruckbarkeit des Kautschuks.

2.12 Herstellung von Lederersatzstoffen

Eine weitere Absatzmöglichkeit der modifizierten Stärken besteht bei der Herstellung von Lederersatzstoffen.

2.13 Stärke in synthetischen Polymeren

Auf dem Kunststoffsektor zeichnen sich folgende Einsatzgebiete ab: die Einbindung von Stärkefolgeprodukten in den Verarbeitungsprozeß (Stärke ist nur Füllstoff, es besteht keine direkte Bindung zwischen synthetischem Polymer und Stärke) oder alternativ die Einbindung von Stärkefolgeprodukten in die Herstellung von Polymeren (Stärke und Polymer gehen eine feste Bindung ein).

15

Die Verwendung der Stärke als reinem Füllstoff ist verglichen mit den anderen Stoffen wie Talkum nicht wettbewerbsfähig. Anders sieht es aus, wenn die spezifischen Stärkeeigenschaften zum Tragen kommen und hierdurch das Eigenschaftsprofil der Endprodukte deutlich verändert wird. Ein Beispiel hierfür ist

20

die Anwendung von Stärkeprodukten bei der Verarbeitung von Thermoplasten, wie Polyethylen. Hierbei werden die Stärke und das synthetische Polymer durch Koexpression im Verhältnis von 1 : 1 zu einem 'master batch' kombiniert, aus dem mit granuliertem Polyethylen unter Anwendung herkömmlicher Verfahrenstechniken diverse Produkte hergestellt werden. Durch die Einbindung von Stärke in

25

Polyethylenfolien kann eine erhöhte Stoffdurchlässigkeit bei Hohlkörpern, eine verbesserte Wasserdampfdurchlässigkeit, ein verbessertes Antistatikverhalten, eine verbesserte Antiblockverhalten sowie eine verbesserte Bedruckbarkeit mit wähligen Farben erreicht werden.

30

Eine andere Möglichkeit ist die Anwendung der Stärke in Polyurethanschäumen. Mit



der Adaption der Stärkederivate sowie durch die verfahrenstechnische Optimierung ist es möglich, die Reaktion zwischen synthetischen Polymeren und den Hydroxygruppen der Stärken gezielt zu steuern. Das Ergebnis sind Polyurethanfolien, die durch die Anwendung von Stärke folgende Eigenschaftsprofile erhalten: eine Verringerung des Wärmeausdehnungskoeffizienten, Verringerung des Schrumpfverhaltens, Verbesserung des Druck/Spannungsverhaltens, Zunahme der Wasserdampfdurchlässigkeit ohne Veränderung der Wasseraufnahme, Verringerung der Entflammbarkeit und der Aufrüsdichte, kein Abtropfen brennbarer Teile, Halogenfreiheit und verminderte Alterung. Nachteile, die gegenwärtig noch vorhanden sind, sind verringerte Druckfestigkeit sowie eine verringerte Schlagfestigkeit.

Die Produktentwicklung beschränkt sich inzwischen nicht mehr nur auf Folien. Auch feste Kunststoffprodukte, wie Töpfe, Platten und Schalen, sind mit einem Stärkegehalt von über 50 % herzustellen. Des Weiteren sind Stärke/Polymermischungen günstig zu beurteilen, da sie eine sehr viel höhere biologische Abbaubarkeit aufweisen.

Außerordentliche Bedeutung haben weiterhin auf Grund ihres extremen Wasserbindungsvermögen Stärkepropolymersate gewonnen. Dies sind Produkte mit einem Rückgrat aus Stärke und einer nach dem Prinzip des Radikalkettenmechanismus aufgeprägten Seitengitters eines synthetischen Monomers. Die heute verfügbaren Stärkepropolymersate zeichnen sich durch ein besseres Binde- und Rückhaltevermögen von bis zu 1000 g Wasser pro g Stärke bei hoher Viskosität aus. Die Anwendungsbereiche für diese Superabsorber haben sich in den letzten Jahren stark ausgeweitet und liegen im Hygienebereich mit Produkten wie Windeln und Unterlagen sowie im landwirtschaftlichen Sektor, z.B. bei Saatgutpflanzungen.

Entscheidend für den Einsatz der neuen, gentechnisch veränderten Stärken sind zum einen die Struktur, Wassergehalt, Proteingehalt, Lipidgehalt, Fasergehalt,

Asche/Phosphatgehalt, Amylose/Amylopektinverhältnis, Molmassenverteilung, Verzweigungsgrad, Korngröße und -form sowie Kristallinität, zum anderen auch die Eigenschaften, die in folgende Merkmale münden: Fließ- und Sorptionsverhalten, Verkleisterungstemperatur, Viskosität, Viskositätsstabilität in Salzlösungen, Dicksungsleistung, Löslichkeit, Kleisterstruktur und -transparenz, Hitze-, Scher- und Säurestabilität, Retrogradationsneigung, Gelbildung, Gefrier/Taufestigkeit, Komplexbildung, Jodbindung, Filmbildung, Klebekraft, Enzymstabilität, Verdaulichkeit und Reaktivität.

Die Erzeugung modifizierter Stärken mittels gentechnischer Verfahren kann zum einen die Eigenschaften der aus der Pflanze gewonnenen Stärke dahingehend verändern, daß weitere Modifikationen mittels chemischer oder physikalischer Verfahren nicht mehr notwendig erscheinen. Zum anderen können die durch gentechnische Verfahren veränderte Stärken weiteren chemischen Modifikationen unterworfen werden, was zu weiteren Verbesserungen der Qualität für bestimmte der oben beschriebenen Einsatzgebiete führt. Diese chemischen Modifikationen sind grundsätzlich bekannt. Insbesondere handelt es sich dabei um Modifikationen durch Hitzebehandlung, Behandlung mit organischen oder anorganischen Säuren, Oxidation und Veresterungen, welche z.B. zur Entstehung von Phosphat-, Nitrat-, Sulfat-, Xanthat-, Acetat- und Citratstärken führen. Des Weiteren können ein- oder mehrwertige Alkohole in Gegenwart starker Säuren zur Erzeugung von Stärkeethern eingesetzt werden, so daß Stärke-Alkylether, O-Alkylether, Hydroxylalkylether, O-Carboxymethylether, N-haltige Stärkeether, P-haltige Stärkeether, S-haltige Stärkeether, vernetzte Stärken oder Stärke-Prop-Polymerivate resultieren.

Eine bevorzugte Verwendung der erfundungsgemäße Stärken liegt in der Herstellung von Verpackungsmaterial und Einwegartikeln.

Zur Expression der erfundungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle in sense- oder antisense-Orientierung in pflanzlichen Zellen werden diese mit regulatorischen



RNA-Elementen verknüpft, die die Transkription in pflanzlichen Zellen bewährtesten. Hierzu zählen insbesondere Promotoren. Generell kommt für die Expression jeder in pflanzlichen Zellen aktive Promotor in Frage.

Der Promotor kann dabei so gewählt sein, daß die Expression konstitutiv erfolgt oder nur in einem bestimmten Gewebe, zu einem bestimmten Zeitpunkt der Pflanzenentwicklung oder zu einem durch äußere Einflüsse determinierten Zeitpunkt. In Bezug auf die Pflanze kann der Promotor homolog oder heterolog sein. Innovalle Promotoren sind z.B. der Promotor der 35S RNA des Cauliflower Mosaic Virus und der Ubiquitin-Promotor aus Mais für eine konstitutive Expression, der 'atatingen-Promotor B33 (Rocha-Sosa et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29) für eine Pollenspezifische Expression in oder ein Promotor, der eine Expression lediglich in photosynthetisch aktiven Geweben sicherstellt, z.B. der ST-LS1-Promotor Stockhaus et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987), 7943-7947; Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989), 2445-2451) oder für eine endosperm-spezifische Expression der HMG-Promotor aus Weizen, der USP-Promotor, der Phasedolin-Promotor oder 'tomotoren von Zein-Genen aus Mais.

Der Promotor kann eine Terminationssequenz vorhanden sein, die der korrekten Beendigung der Transkription dient sowie der Addition eines Poly-A-Schwanzes an das Transkript, dem eine Funktion bei der Stabilisierung der Transkripte eigemessen wird. Derartige Elemente sind in der Literatur beschrieben (vgl. Gleilen et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29) und sind beliebig austauschbar.

Die vorliegende Erfindung stellt Nucleinsäuremoleküle zur Verfügung, die ein Protein mit der Funktion einer Isoamylase aus Weizen codieren. Die Erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle erlauben die Herstellung dieses Enzyms, dessen funktionale Identifizierung innerhalb der Stärkebiosynthese, die Herstellung gentechnisch veränderter Pflanzen, bei denen die Aktivität dieses Enzyms verändert ist und ermöglicht somit die Synthese einer Stärke mit veränderter Struktur und veränderten physikalisch-chemischen Eigenschaften in

derartig modifizierten Pflanzen.



Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle können prinzipiell auch dazu verwendet werden, Pflanzen herzustellen, in denen die Aktivität der erfindungsgemäßen Isoamylase erhöht oder verringert ist und gleichzeitig die Aktivitäten anderer, an der Stärkebiosynthese beteiligter Enzyme verändert sind. Durch die Veränderung der Aktivitäten einer Isoamylase in Pflanzen kommt es zur Synthese einer in ihrer Struktur veränderten Stärke. Ferner können Nucleinsäuremoleküle, die eine Isoamylase codieren oder entsprechende antisense-Konstrukte, in Pflanzenzellen eingebracht werden, bei denen bereits die Synthese endogener Stärkesynthasen oder von Verzweigungsenzymen inhibiert ist (wie z.B. in WO 92/14827 oder Shanton und Garwood, 1984, in Whistler, BeMiller und Paschall, Starch: Chemistry and Technology, Academic Press, London, 2nd Edition, 25-86).

15 Soll die Inhibition der Synthese mehrerer an der Stärkebiosynthese beteiligter Enzyme in transformierten Pflanzen erreicht werden, so können DNA-Moleküle zur Transformation verwendet werden, die gleichzeitig mehrere, die entsprechenden Enzyme codierenden Regionen in antisense-Orientierung unter der Kontrolle eines geeigneten Promotors enthalten. Hierbei kann alternativ jede Sequenz unter der Kontrolle eines eigenen Promotors stehen, oder die Sequenzen können als Fusion von einem gemeinsamen Promotor transkribiert werden bzw. unter der Kontrolle eines gemeinsamen Promotors stehen. Letztere Alternative wird in der Regel vorzuziehen sein, da in diesem Fall die Synthese der entsprechenden Proteine in etwa gleichem Maße inhibiert werden sollte. Für die Länge der einzelnen codierenden Regionen, die in einem derartigen Konstrukt verwendet werden, gilt das, was oben bereits für die Herstellung von antisense-Konstrukten ausgeführt wurde. Eine obere Grenze für die Anzahl der in einem derartigen DNA-Molekül von einem Promotor aus transkribierten antisense-Fragmente gibt es nicht. Das entstehende Transkript sollte aber in der Regel eine Länge von 10 kb, vorzugsweise

von 5 kb nicht überschreiten.



Beispiele für derartige Vektoren sind pBR322, pUC-Serien, M13mp-Serien, pACYC184 usw.. Die gewünschte Sequenz kann an einer passenden

codierenden Regionen in antisense-Orientierung hinter einem geeigneten Promotor

lokalisiert sind, können aus DNA-Sequenzen stammen, die für folgende Proteine codieren: Stärkekorn-gebundene (GBSS I und II) und lösliche Stärkesynthetasen.

(SSS I und II), Verzweigungsenzyme (Isoamylasen, Pullulanasen, R-Enzyme,

"Branching"-Enzyme, "Debranching"-Enzyme), Stärkephosphorylasen und Disproportionierungsenzyme. Dies ist nur eine beispielhafte Aufzählung. Auch die

Verwendung anderer DNA-Sequenzen im Rahmen einer derartigen Kombination ist denkbar.

Mit Hilfe derartiger Konstrukte ist es möglich, in Pflanzenzellen, die mit diesen transformiert wurden, die Synthese mehrerer Enzyme gleichzeitig zu inhibieren.

5 Weiterhin können die Konstrukte in pflanzliche Mutanten eingebracht werden, die

für ein oder mehrere Gene der Stärkebiosynthese defekt sind (Shannon und

Garwood, 1984, in Whistler, BeMiller und Paschall: Starch:Chemistry and

Technology, Academic Press, London, 2nd Edition: 25-86). Diese Defekte können

sich auf folgende Proteine beziehen: Stärkekorn-gebundene (GBSS I und II) und

lösliche Stärkesynthetasen (SSS I und II), Verzweigungsenzyme (BE I und II),

"Debranching"-Enzyme (R-Enzyme), Disproportionierungsenzyme und

Stärkephosphorylasen. Dies ist nur eine beispielhafte Aufzählung.

5 Mit Hilfe einer derartigen Vorgehensweise ist es weiterhin möglich, in Pflanzenzellen, die mit diesen transformiert wurden, die Synthese mehrerer Enzyme gleichzeitig zu inhibieren.

Zur Vorbereitung der Einführung fremder Gene in höhere Pflanzen stehen eine große Anzahl von Klonierungsvektoren zur Verfügung, die ein Replikationssignal für E.coli und ein Markergen zur Selektion transformierter Bakterienzellen enthalten.

15 Für die Einführung von DNA in eine pflanzliche Wirtszelle stehen eine Vielzahl von Techniken zur Verfügung. Diese Techniken umfassen die Transformation pflanzlicher Zellen mit T-DNA unter Verwendung von Agrobacterium tumefaciens oder Agrobacterium rhizogenes als Transformationsmittel, die Fusion von Protoplasten, die Injektion, die Elektroporation von DNA, die Einbringung von DNA mittels der biolistischen Methode sowie weitere Möglichkeiten.

20 Bei der Injektion und Elektroporation von DNA in Pflanzenzellen werden an sich keine speziellen Anforderungen an die verwendeten Plasmide gestellt. Es können einfache Plasmide wie z.B. pUC-Derivate verwendet werden. Sollen aber aus derartig transformierten Zellen ganze Pflanzen regeneriert werden, ist in der Regel die Anwesenheit eines selektierbaren Markergens notwendig.

25 Je nach Einführungsmethode gewünschter Gene in die Pflanzenzelle können weitere DNA-Sequenzen erforderlich sein. Werden z.B. für die Transformation der Pflanzenzelle das Ti- oder Ri-Plasmid verwendet, so muß mindestens die rechte Begrenzung, häufig jedoch die rechte und linke Begrenzung der Ti- und Ri-Plasmid



DNA als Flankenbereich mit den einzuführenden Genen verbunden werden.

erden für die Transformation Agrobakterien verwendet, muß die einzuführende NA in spezielle Plasmide cloniert werden, und zwar entweder in einen intermediären Vektor oder in einen binären Vektor. Die intermediären Vektoren innen aufgrund von Sequenzen, die homolog zu Sequenzen in der T-DNA sind, sich homologe Rekombination in das Ti- oder Ri-Plasmid der Agrobakterien integriert werden. Dieses enthält außerdem die für den Transfer der T-DNA notwendige vir-Region. Intermediäre Vektoren können nicht in Agrobakterien replizieren. Mittels eines Helferplasmids kann der intermediäre Vektor auf

Agrobacterium tumefaciens übertragen werden (Konjugation). Binäre Vektoren innen sowohl in *E. coli* als auch in Agrobakterien replizieren. Sie enthalten ein elektionsmarker-Gen und einen Linker oder Polylinker, welche von der rechten und linken T-DNA Grenzregion eingerahmt werden. Sie können direkt in die Agrobakterien transformiert werden (Holstens et al. Mol. Gen. Genet. 163 (1978), 31-187). Das als Wirtszelle dienende Agrobakterium soll ein Plasmid, das eine vir-

egion trägt, enthalten. Die vir-Region ist für den Transfer der T-DNA in die Pflanzenzelle notwendig. Zusätzliche T-DNA kann vorhanden sein. Das derartig transformierte Agrobakterium läßt sich zur Transformation von Pflanzenzellen verwenden.

Die Verwendung von T-DNA für die Transformation von Pflanzenzellen ist intensiv untersucht und ausreichend in EP 120 516: Hoekema, In: The Binary Plant Vector System Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblaserdam (1985), Chapter V; Fraley et al., rit. Rev. Plant. Sci., 4, 1-46 und An et al. EMBO J. 4 (1985), 277-287 beschrieben

orden.

Über den Transfer der DNA in die Pflanzenzelle können Pflanzen-Explantate weckmäßigweise mit Agrobacterium tumefaciens oder Agrobacterium lizogenes kokultiviert werden. Aus dem infizierten Pflanzenmaterial (z.B. Blattstücke, Stengelsegmente, Wurzeln, aber auch Protoplasten oder Suspensionsultivierte Pflanzenzellen) können dann in einem geeigneten Medium, welches

Antibiotika oder Biozide zur Selektion transformierter Zellen enthalten kann, wieder ganze Pflanzen regeneriert werden. Die so erhaltenen Pflanzen können dann auf Anwesenheit der eingeführten DNA untersucht werden. Andere Möglichkeiten der Einführung fremder DNA unter Verwendung des biolistischen Verfahrens oder durch

5 Protoplastentransformation sind bekannt (vgl. z.B. Willmitzer, L., 1993 Transgenic plants. In: Biotechnology, A Multi-Volume Comprehensive Treatise (H.J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, P. Städler, eds.), Vol. 2, 627-659, VCH Weinheim-New York-Basel-Cambridge).

10 Während die Transformation dikotyler Pflanzen über Ti-Plasmid-Vektorsysteme mit Hilfe von Agrobacterium tumefaciens wohl etabliert ist, weisen neuere Arbeiten darauf hin, daß auch monokotyle Pflanzen der Transformation mittels Agrobacterium basierender Vektoren sehr wohl zugänglich sind (Chan et al., Plant Mol. Biol. 22 (1993), 491-506; Hiei et al., Plant J. 6 (1994), 271-282).

15 Alternative Verfahren zur Transformation von monokotylen Pflanzen bestehen mittels des biolistischen Ansatzes, der Protoplastentransformation oder der physikalisch oder chemisch induzierten DNA-Aufnahme in Protoplasten, z.B. durch Elektroporation von partiell permeabilisierten Zellen, Transfer von DNA mittels Glasfasern, Makroinjektion von DNA in Blütenstände, die Mikroinjektion von DNA in Mikrospermen oder Pro-Embryonen, die DNA-Aufnahme durch keimenden Pollen und die DNA-Aufnahme in Embryonen durch Quellung (zur Übersicht: Polnykus, Physiol. Plant (1990), 269 – 273).

20 Drei der oben genannten Transformationssysteme konnten in der Vergangenheit für verschiedene Getreide etabliert werden: die Elektroporation von Gewebe, die Transformation von Protoplasten und der DNA-Transfer durch Partikel-Beschuß in regenerierbare Gewebe und Zellen (zur Übersicht: Jähne et al., Euphytica 85 (1995), 35 – 44).

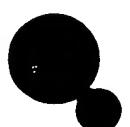
25



Die Transformation von Weizen wird in der Literatur verschiedentlich beschrieben (zur Übersicht: Maheshwari et al., Critical Reviews in Plant Science 14 (2) (1995), 149 bis 178): Hess et al. (Plant Sci. 72 (1990), 233) benutzten das Verfahren der Makroinjektion, um Pollen und Agrobakterien in unmittelbare Nähe zu bringen. Die 5 Mobilisierung des Plasmids, daß das *nptII* Gen als selektierbaren Marker enthielt, wurde mittels Southern Blot Analyse und NPTII Test nachgewiesen. Die Transformanten zeigten einen normalen Phänotyp und waren fertil. Die Kanamycin-Resistenz konnte in zwei aufeinanderfolgende Generationen nachgewiesen werden. Die 10 erste transgene, fertile Weizenpflanze, die nach Beschuß mit Mikroprojektilen gebundener DNA regeneriert werden konnte, wurde von Vasil et al. (Bio/Technology 10 (1992), 667 – 674) beschrieben. Das Zielgewebe für den Beschuß war eine embryogene Kalluskultur (Typ C Kallus). Als Selektionsmarker wurde das bar Gen eingesetzt, das eine Phosphinothricin Acetyltransferase codiert und somit eine Resistenz gegen das Herbizid Phosphinothricin vermittelt. Ein weiteres System 15 wurde von Weeks et al. (Plant Physiol. 102 (1993), 1077 – 1084), sowie Becker et al. (Plant J. 5(2) (1994), 299 – 307) beschrieben. Hier ist das Zielgewebe für die DNA-Transformation das Skutellum unreifer Embryonen, das in einer einleitenden *in vitro* Phase zur Induktion somatischer Embryonen angeregt wurde. Die Effizienz der Transformation liegt bei dem von Becker et al. (loc. cit.) entwickelten System mit 1 20 transgene Pflanze pro 83 Embryonen der Sorte "Florida" deutlich höher als bei dem von Weeks et al. etablierten System mit 1 bis 2 transgenen Pflanzen pro 1000 Embryonen der Sorte "Bohwhite".

Das von Becker et al. (loc. Cit) entwickelte System bildet die Basis für die in den 25 Beispielen beschriebenen Transformations-experimente.

Ist die eingefügte DNA einmal im Genom der Pflanzenzelle integriert, so ist sie dort in der Regel stabil und bleibt auch in den Nachkommen der ursprünglich transformierten Zelle erhalten. Sie enthält normalerweise einen Selektionsmarker, der den transformierten Pflanzenzellen Resistenz gegenüber einem Biozid wie 30 Phosphinothricin oder einem Antibiotikum wie Kanamycin, G 418, Bleomycin oder

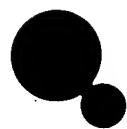


Hygromycin vermittelt. Der individuell gewählte Marker sollte daher die Selektion transformierter Zellen gegenüber Zellen gestatten, denen die eingeführte DNA fehlt. 5 Die transformierten Zellen wachsen innerhalb der Pflanze in der üblichen Weise (siehe auch McCormick et al., Plant Cell Reports 5 (1986), 81-84). Die resultierenden Pflanzen können normal angezogen werden und mit Pflanzen, die die gleiche transformierte Erbanlage oder andere Erbanlagen besitzen, gekreuzt werden. Die daraus entstehenden hybriden Individuen haben die entsprechenden phänotypischen Eigenschaften. Von den Pflanzenzellen können Samen gewonnen 10 werden. Es sollten zwei oder mehrere Generationen angezogen werden, um sicherzustellen, daß das phänotypische Merkmal stabil beibehalten und vererbt wird. Auch sollten Samen geerntet werden, um sicherzustellen, daß der entsprechende Phänotyp oder andere Eigenarten erhalten geblieben sind. 15 Die nachfolgenden Beispiele sollen die Erfindung illustrierten und stellen keinerlei Beschränkung dar.

1. Clonierungsverfahren 20 Zur Clonierung in *E. coli* wurde der Vektor pBluescript II SK (Stratagene) verwendet.

25 2. Bakterienstämme

Für den Bluescript-Vektor und für die antisense-Konstrukte wurde der *E. coli* Stamm DH5 α (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, USA) verwendet. Für die *in vivo* Excision wurde der *E. coli*-Stamm XL1-Blue 25 verwendet.



Transformation unreifer Weizenembryonen

Medien

1S:	100 ml/l Makrosalz 1 ml/l Mikrosalz 2 ml/l Fe/NaEDTA 30 g/l Saccharose	(D. Becker und H. LÖRZ, Plant Tissue Culture Manual (1996), B 12:1-20)
30:	MS + 2,4-D (2 mg/l)	
31:	MS + 2,4-D (2 mg/l) + aktive Komponente des Herbizids BASTA (2 mg/l)	Phosphinothricin (PPT,
32:	MS + 2,4-D (0,1 mg/l) + PPT (2 mg/l)	
39:	MS + 2,4-D (2 mg/ml) + je 0,5 N Mannit/Sorbit	
3:	Die angegebenen Medien wurden auf den pH-Wert 5,6 mit KOH eingestellt und mit 3 % Gelrite verfestigt.	
15:		Die Markierung von DNA-Fragmenten, die als Screeningsonden eingesetzt wurden, erfolgte über eine spezifische PCR unter Einbau von DIG-markiertem dUTP (Boehringer Mannheim, Deutschland).
20:	20 x SSC 88,2 g Natrium-Citrat ad 1000 ml mit ddH ₂ O pH 7,0 mit 10 N NaOH	In den Beispielen verwendete Medien und Lösungen:
25:		Beispiel 1: Identifizierung, Isolierung und Charakterisierung einer cDNA, die eine Isoamylase (sugary-homolog) aus Weizen (<i>Triticum aestivum</i> <i>L.</i> , cv Floridal) codiert

Die Methode zur Transformation unreifer Embryonen aus Weizen wurde von Becker und LÖRZ (D. Becker und H. LÖRZ, Plant Tissue Culture Manual (1996), B 12: 1 bis 20) entwickelt und optimiert.

Den nachfolgend beschriebenen Experimenten wurde sich an das von Becker und LÖRZ (loc. cit.) ausgearbeitete Protokoll gehalten.

Bei Transformation werden Ähren mit Karyopsen der Entwicklungsstufe 12 bis 14



Tage nach Anthesis geerntet und oberflächensterilisiert. Die isolierten Skutellä werden mit der dem Medium zugewandten Embryoachse auf Induktionsmedium # 30 plattiert.

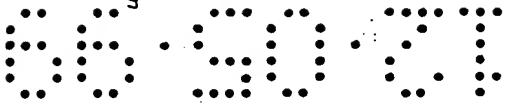
5	Nach 2 bis 4 tägiger Vorkultur (26°C, dunkel) werden die Explantate auf Medium # 39 zur osmotischen Vorkultur (2 bis 4 h, 26°C, dunkel) umgesetzt.
10	Zur biolistischen Transformation werden pro Schuß ca. 29 µg Goldpartikel, auf die zuvor wenige µg der Ziel-DNA gefällt wurde, eingesetzt. Da es sich bei den durchgeführten Experimenten um Co-Transformanten handelt, wird die Ziel-DNA in einem Verhältnis von 1:1, bestehend aus dem Zielgen und einem Resistenzmarken (bar-Gen) dem Fällungsansatz zugegeben.

10	Zur biolistischen Transformation werden pro Schuß ca. 29 µg Goldpartikel, auf die zuvor wenige µg der Ziel-DNA gefällt wurde, eingesetzt. Da es sich bei den durchgeführten Experimenten um Co-Transformanten handelt, wird die Ziel-DNA in einem Verhältnis von 1:1, bestehend aus dem Zielgen und einem Resistenzmarken (bar-Gen) dem Fällungsansatz zugegeben.
15	4. DIG-Markierung von DNA-Fragmenten
20	In den Beispielen verwendete Medien und Lösungen:
25	Beispiel 1: Identifizierung, Isolierung und Charakterisierung einer cDNA, die eine Isoamylase (sugary-homolog) aus Weizen (<i>Triticum aestivum</i> <i>L.</i> , cv Floridal) codiert

Die Methode zur Transformation unreifer Embryonen aus Weizen wurde von Becker und LÖRZ (D. Becker und H. LÖRZ, Plant Tissue Culture Manual (1996), B 12: 1 bis 20) entwickelt und optimiert.

Den nachfolgend beschriebenen Experimenten wurde sich an das von Becker und LÖRZ (loc. cit.) ausgearbeitete Protokoll gehalten.

Bei Transformation werden Ähren mit Karyopsen der Entwicklungsstufe 12 bis 14



Zur Identifizierung einer cDNA, die eine Isoamylase (sugary) aus Weizen codiert, wurde die Strategie des heterologen Screening verfolgt. Hierfür wurde eine cDNA-Bank aus Weizen mit einer 'sugary'-Sonde aus Mais durchmusterter.

5

Die Isolierung der Sonde (sugary-Sonde) aus einer Mais cDNA Bank erfolgte mittels spezifischer Primer durch PCR-Amplifikation. Die Clonierung der Mais

cDNA Bank erfolgte aus poly(A) + RNA aus einem Gemisch gleicher Anteile

13,17,19,20,22,25 und 28 Tage (DAP) alter Karyopsen in einem Lambda Zap II

10 Vektor analog den Angaben des Herstellers (Lambda ZAP II-cDNA Synthesis Kit

Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland). Bei allen verwendeten Karyopsen, außer bei den 13 Tage alten Körnern, war vor der RNA-Isolierung der Embryo

entfernt worden.

15 Die Amplifizierung des DNA-Fragments, das als Sonde zur Durchmusterung der

Weizen cDNA Bank eingesetzt wurde, erfolgte mit den folgenden Primern:

su1p-1a: 5' AAAGGCCAATATTACCTTTAGG 3' (Seq.ID No. 4)

su1p-2: 5' GCCATTTCAACCGTTCTGAAGTCGGGAAGTC 3' (Seq.ID No. 5)

20 Als Template für die PCR-Reaktion wurden 2 µl der amplifizierten Mais cDNA

Bank eingesetzt. Die PCR-Reaktion enthielt des weiteren 1,5-3mM MgCl₂, 20mM

Tris-HCl (pH 8,4), 50mM KCl, 0,8mM dNTP Mix, 1µM Primer su1p-1a, 1µM

Primer su1p-2 und 2,5 Units Taq Polymerase (rekombinant, Life Technologies).

Die Amplifizierung wurde mit einem Triblock der Firma Biometra nach dem

25 Schema: 4 ° (min)/ 95°C; 1 ° 95°C; 45 ° (sek)/ 58°C; 1 ° 15 ° / 72°C; 30 Cycles

5 ° / 72°C. Die amplifizierte DNA Bande von ca. 990 bp wurde in einem Agarosegel aufgetrennt und ausgeschnitten. Von diesem Fragment wurde nach

dem gleichen Schema wie oben beschrieben eine zweite Amplifizierung durchgeführt. Das aus dieser zweiten Amplifizierung erhaltene 990 bp Fragment

30 wurde mit dem Restriktionsenzym *BAM* HI in ein 220 bp und ein 770 bp

Fragment zerschnitten. Nach nochmaliger Auf trennung des sugary-Fragments in

einem Agarosegel, Ausschneiden der Bande und Isolierung des Fragmentes erfolgte die DIG-Markierung der Sonde. Zur 'random prime' Markierung mit Digoxigenin wurden 500 ng sugary Fragment eingesetzt. Zu dem zu

markierenden Fragment wurden 10 µl Random Primer gegeben und die Reaktion

5 wurde 5 ° bei 95-100°C erhitzt. Nach dem Erwärmen wurden 0,1mM dATP,

0,1mM dGTP, 0,1mM dCTP und 0,065mM dTTP und 0,035 mM Digoxigenin-11-dUTP (Boehringer Mannheim), sowie Klenow Puffer (Standard) und 1 Unit

Klenow Polymerase zugegeben. Die Reaktion wurde bei RT (Raumtemperatur) über Nacht durchgeführt. Zur Kontrolle der Markierung wurde ein Dot-Test

10 analog den Angaben des Herstellers ('The DIG System User's Guide for Filter Hybridization' der Firma Boehringer, Mannheim, Deutschland) durchgeführt.

Die Synthese der Weizen cDNA Bank erfolgte aus poly(A) + RNA von ca.21 Tage ('starchy'-Endosperm) alten Karyopsen in einen Lambda Zap II Vektor

15 entsprechend den Angaben des Herstellers (Lambda ZAP II-cDNA Synthesis Kit Stratagene GmbH, Heidelberg). Nach Titerbestimmung der cDNA-Bank konnte

ein Primärtiter von $1,26 \times 10^6$ pfu/ml ermittelt werden.

Zum Durchmuster der Weizen cDNA Bank wurden ca. 350.000 Phagen

20 ausplattiert. Ausplattieren der Phagen und Abziehen der Platten erfolgte nach Standardprotokollen. Die Prähybridisierung und Hybridisierung der Filter wurde in

5X SSC, 3% Blocking (Boehringer, Mannheim), 0,2% SDS, 0,1% Natrium

Laurilsarcosin und 50 µg/ml Herringssperma DNA bei 55°C durchgeführt. Der

25 Hybridisierungslösung wurde 1ng/ml der markierten sugary Sonde zugesetzt und die Hybridisierung über Nacht inkubiert. Gewaschen wurden die Filter für 2X5 °

in 2X SSC, 1% SDS bei RT; 2X 10 ° in 1X SSC, 0,5% SDS bei 55°C; 2x 10 ° in

0,5X SSC, 0,2% SDS bei 55°C. Positive Clone wurden durch 2 weitere

Screening Runden vereinzelt. Über *in vivo* Excision wurden vereinzelte Clone als

30 *Bluescript SK* Phagemide erhalten (Durchführung analog den Angaben des Herstellers; Stratagene, Heidelberg, Deutschland).



Nach Analyse der Clone über Minipräparierung und Restringierung der Plasmid-DNA wurde der Clon Tasu-19 weiter analysiert.

Beispiel 2: Sequenzanalyse der cDNA-Insertionen des Plasmids pTaBE2

Aus dem Clon Tasu-19 wurde die Plasmid-DNA isoliert und die Sequenz der cDNA-Insertionen mittels der Didesoxynukleotidmethode (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463-5467) bestimmt.

Die Insertion des Clons Tasu-19 ist 2997 bp lang und stellt eine partielle cDNA dar. Die Nucleotidsequenz ist unter Seq ID No. 1 angegeben.

Eine Vergleich mit bereits publizierten Sequenzen zeigt, daß die unter Seq ID No. 1 dargestellte Sequenz neu ist und eine codierende Region umfaßt, die Homologien zu Isoamylasen aus anderen Organismen aufweist.

Die Analyse der Sequenz zeigt auch, daß sich in der cDNA Sequenz zwei Introns in den Positionen 296-396 (Intron 1) und 1617-2144 (Intron 2) befinden.

Werden diese Introns entfernt, läßt sich eine Proteinsequenz ableiten, die Homologien zu den Proteinsequenzen von Isoamylasen anderer Organismen aufweist. Die zu den codierenden Bereichen der Seq ID No. 1 korrespondierende Aminosäure-Sequenz ist unter Seq ID No. 3 dargestellt.

Beispiel 3 Herstellung des Pflanzentransformationsvektors pTa-alpha-su 19

Für die Expression einer antisense-RNA zu der isolierten cDNA aus Weizen wurden auf der Grundlage des Basisplasmids pUC19 der Pflanzentransformationsvektor pTa-alpha-su19 konstruiert, indem die cDNA-Insertion des Plasmids pTa-alpha-su19 in antisense-Orientierung mit dem 3'-Ende des Ubiquitin-Promotors verbunden wurden. Dieser Promotor besteht aus dem ersten untranslatierten Exon und dem ersten Intron des *ubiquitin 1* Gens aus Mais



(Christensen A.H. et al., Plant Molecular Biology 18 (1992), 675-689). Teile des Polylinkers und der NOS-Terminator stammen aus dem Plasmid pAct1.cas (CAMBIA, TG 0063; Cambia, GPO Box 3200, Canberra ACT 2601, Australia). Vektorkonstrukte mit diesem Terminator und Konstrukten, die auf pAct1.cas basieren, sind in McElroy et al. (Molecular Breeding 1 (1995), 27-37) beschrieben. Der so entstandene Vektor wird pUBi.cas genannt.

Die Klonierung des Vektors erfolgt durch Restriktion eines 2kb Fragmentes aus dem Klon Ta-su19 mit dem Restriktionsenzym *Xba* I. Das Fragment wurde an den Enden mittels einer Klenow Reaktion aufgefüllt und anschließend in die

Sma I Klonierungsstelle des Expressionsvektors pUBi.cas ligiert.

Der entstandene Expressionsvektor wird als Ta-alpha-su 19 bezeichnet und wird wie oben beschrieben zur Transformation von Weizen verwendet.

66-90-01

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO. 1 (cDNA aus 2997b mit 2 Introns):

5 TCGGGAGGT GTGGCGCGG GTTGTCAGG CGGGACGAA GTAGAGGAC GAGGGAGG
 AGGACGAGC GGTGGCGAG GACAGGAG CGCTGGGG CGCTGCAAG CTGCTCGG 60
 5 GAAATGCCGC GCGCTGGC GCCACCGC TGGCGGGG GSTCAATTG CGCGCTATT 120
 10 CCGGGGAGC CACGGCGG AGCTCTCC TCTTCAGCC AGAAGATCTC AAGGGGG 180
 GGTGGCTCC CGAGTAGAGT TCTACAGCTT TCGTGGCC GCGCCTT TTTGGCC
 15 TGCATTTAA GTTTGTACT GGGCAATG CTGAGGATA GGTTGACCA GGAGGTTCC 240
 CTCAGACATC TCTACAGTC CAGCTGGT GACGGGAAC GTGGCGATG TCTTCATGA AGCGAGCTG 300
 10 TCCAGCCATG TCACTTTA GGGGGAGA AGAACTATA TTGATTCCC CCCAAAG 360
 AGGCCATCTC AGAACATCA GGTAAAGTGC TTTCGTGA AGAAAGGAA AGGACTCT 420
 15 CACACATTC TTTACGGTAA CAGCTTCGAC GGCACCTG CTCTCACTC CGGGCACTAC 480
 20 CTTGATGTT CCAATGTCGTT AGTGGATCT TATGCTAAGG CAGTGTATAG CGGAGGGAG 540
 TATGTTGTC CACGGCGTGC TAAACATTC TGGCTCTAGA TGGCTGGCAT GATCCCTCTT 600
 25 CCATATAGCA CGTTGATG GGAGGGAC CTACCTCTAA GATATCTCA AAAGGGCTG 660
 GAAATATATG AGATGCACT GCGTGAATC AGGAAGCATG ATTCAAGCA TGTAGACAT 720
 CCGGGTACTT TCAATGGAGC TGTGTCAAG CTGACTATT TGAAGGAGT TGGAGTTAT 780
 30 TGTATGAAAT TAATGCCCTG CCATGAGTC AACGAGCTG AGTACTCAAC CTCTCTCC 840
 AAGATGAACT TTGGGGATA TTCTACACATA AACTCTTT CACCAATGAC AGATACACA 900
 35 TCAAGGGGGAA TAAAGAAGT TGGGGTGTAT GGCATAAATG AGTTCAAAAC TTTGTAGA 960
 GAGGCTCACA AACGGGGAAAT TCAAGGGTGTAT CTGGATGTC ATTATCAACCA TACAGTGAG 1020
 40 GGTAAATGAGA ATGGTCCAAAT ATTATCAATT AAGGGGTGCA ATTAACTAC ATTACTATG 1080
 CTTGCACCCA AGGGAGAGT TTAACTAT TCTGGCTGTG GGAATACCTT CAACTGAAAT 1140
 CATCTCTGTC TTCTCAATT CATTGAGAT TGTAAAGAT ACTGGGTGAC GGAATGCAAT 1200
 45 GTGATGATGTT TCTCTTCA TCTTGCAATCC ATAATGACCA GAGGTTCAG TCTGTGGAT 1260
 CCAGTTAACG TGTATGGAGC TCCAATAGAA GTGACATGA TCACACACAG GACACTCTT 1320
 GTTACTCCAC CACTTATCA CATGATCAGC AATGACCCAA TCTGTGGAG CGTCAGCTC 1380
 50 ATTGCTGAAG CATGGATGC AGGAGGCTC TATCAAGTAG GTCAATCTCC TCACTGGAT 1440
 GTTGGCTCTG AGTGGATGG GAAGTACCG GACATTGTC GTCAATCTCAT TAAGGCACT 1500
 55 GATGGATTG CTGGTGTGTT TGCGAATGT CTTGTGAA GTCCACACCT ATACAGGTA 1560
 1620

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO. 3 (Aminosäuresequenz aus 764 Aminosäuren):

5 AGTGTGGCA ATACTGTAA ATGAGTGG TGAATGTCAC CTGGATTIT TATATAACC 1680
 ACATGATGAT AGACATCTAA ATATAAACA ATCATAGTGT ATGCAATATGC ATTGGCTAA 1740
 5 GAAGTATAG TGTATGACT AGTGTATAT ATAGGTTTA ACACCAACT TCCCATGAA 1800
 GGAACATAGG GCTTCTACT TACCTTATT ATTGTCCC TGATAATTC ACTGAAAAT 1860
 10 TCCAGCCATG TCACTTTA GGGGGAGA AGAACTATA TTGATTCCC CCCAAAG 1920
 AGGCCATCTC AGAACATCA GGTAAAGTGC TTTCGTGA AGAAAGGAA AGGACTCT 1980
 15 ACTTCTCTAC TGTGCTACT TAGCTGATG TATATTGTA AGATGAATG CAAATTAA 2040
 TTTGGATA ATTGTGCTG TTATTCAAC ATTCTATIT GCTTCCTA GAAATCAAC 2100
 CAGTAACTG TTTGGCAC TGCACACTCT TATTGATTA TCAAGGAGGA GGAGGAAAC 2160
 20 CTTGGCACAG TATCAACTT GTATGTGAC ATGATGGATT TACACTGGCT GATTTGGTA 2220
 CATAATAATA GAGTACAT TTACCAATG GGGAGAACHA CAGAGTGA GAAATCACA 2280
 25 ACTCTTAGCTG GATTGGGG GAGGAAGGAG AATTGGCAAG ATTGTCTGTC AAAGATGA 2340
 GGAAGAGCA GATGCGAAAT TTCTTGTT GTCTCATGTT TTCTCANGA GTTCCAACT 2400
 TCTCATGGG TGTGAATAT GGCACACACAA AAGGGGCA CAACTATCA TACTGCCATG 2460
 30 ATTCTTATGT CTTATTTT CGCTGGATA AAAAGAACAA ATACTCTGAG TTGACCGAT 2520
 TCTGCTGCT CATGACCAA TTCCGCAAG AGTGGAGG TCTGGCTT GAGGACTTC 2580
 35 CAACGGCCAA ACGGCTGAG TGGCATGTC ATCAGCCTG GAGCCTGTAT TGGCTGAGA 2640
 ATACCCGATT CGTGCCTT TCCATGAAAG ATGAAGAAC GGGGAGATC TATGCGCT 2700
 TCAACACCGAG CCACCTACCG GCGCTGTT AGCTCCAGA GCGGAGGG CCCGGGG 2760
 40 AACGGGTGT GGACACAGGC AGCCAGCAC CATAAGACTT CCTCACCCAC GACTTACCTG 2820
 ATCGGGCTCT CACCATCAC CAGTCTCGC ATTCTCTCTA CTCCACCTC TACCCCTGC 2880
 45 TAGCTACTC ATGGTCATC CTAGTATGC GCCCTGATGT TTGAGAGACC AAATATACAA 2940
 GAAATAATA TGTCTATAG TAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAA 2997
 50 SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO. 3 (Aminosäuresequenz aus 764 Aminosäuren):
 SGPAPRRLRW RENATAGKGV GEVCAAVVE ATRVEDEGEE DEPVADRYA LGGACRYLAG 60
 NPAPLGATAL AGGVNFAVS GGATAAALCL FTPEDLADR VTEEVPLDPL MNRTGIVWWV 120

FIEGELHNML YGYRFOGTF A PHCGHQLDVS NWVWDPYAKA VSRGEYGV P ARGNNNCWPOM 180
AGMIPLPYST FDWEGDLPLR YPQKDVLVYE MHLRGFTKHD SSNEHPGTF IGAWSKLDYL 240
KELGVNCIEL MPCHEFHELE YSTSSSKMNF WGYSTINFFS PMTRYTSGGI KNGGRDAINE 300
FKTFVREAHK RGEVILDVV FNRHTAEGNEN GPILSKGVD NTYVMLAPK GEFYNYSGCG 360
NTFNCNHPV RQFIVDCLRY WTEMHVDGF RFDLASMTR GSSLWDPVN V GAPIEGOMI 420
TTGTPLVTPP LIQMSNDPI LGGVKLLAEA WDAGGLYAVG QPHHNWVSE WNGKYRDIVR 480
QFIKGTDGFA GGFAECICGS PHLYGAGGRK PWHSINFVCA HDGFTLADLV TYNKKYNLPN 540
GENNIRDGENH NLSWNGGEEG EFARLSVKRL RKROMRNFF CLMVSQGVPM FYMGDEYGHT 600
KGGNINNTYCH DSYVNYFRWD KKEQYSELHR FCGLMTKFRK ECEGLGLEDF PTAKRLOWHG 660
HQPGKPDWSE NSRFVAFSMK DERQEIMVA FNTSHLPAW ELPERAGRRW ERVWDTGKPA 720
PYDFLTDDLP DRALTHQFS HFLYNSLYPM LSYSSVILVL RPDV 764

Die Aminosäuresequenz ist mittels Einbuchstaben-Code für Aminosäuren dargestellt (vgl. z.B. Stryer, Biochemie, 1990, Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH, Heidelberg, ISBN 3-89330-690-0).

Patentansprüche:

AGR 98M 206

44

1. Nucleinsäuremolekül, codierend ein Protein mit der Funktion einer Isoamylase aus Weizen, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, das die unter Seq ID NO. 3 angegebene Aminosäuresequenz umfasst,

(a) Nucleinsäuremolekül, das die unter Seq ID No. 1 dargestellte Nucleinsäuresequenz oder Teile davon umfassen oder eine Nucleotidsequenz oder Ribonucleotidsequenz;

(b) Nucleinsäuremolekülen, die mit den unter (a) oder (b) genannten Nucleotidsequenzen hybridisieren oder komplementär sind, und Nucleinsäuremolekülen, deren Nucleotidsequenz aufgrund der Degeneration des genetischen Codes von der Sequenz der unter (a), (b) oder (c) genannten Nucleinsäuremoleküle abweicht.

15

2. Nucleinsäuremoleküle nach Anspruch 1, das ein DNA-Molekül ist.

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

AAAGGCCCAA TATTATCCTT TAGG 24

3. DNA-Molekül nach Anspruch 2, das ein cDNA-Molekül ist.

20 4. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 1, das ein RNA-Molekül ist.

5. Nucleinsäuremolekül, das spezifisch mit einem Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 4 hybridisiert.

25 6. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 5, das ein Oligonucleotid mit einer Länge von mindestens 15 Nucleotid ist.

7. Vektor, enthaltend ein DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 1 bis 4.

31

30

47

27. Verwendung der Stärke nach Anspruch 18 oder 26 zur Herstellung von Nahrungsmitteln, vorzugsweise von Back- oder Teigwaren.

28. Verwendung der Stärke nach Anspruch 18 oder 26 zur Herstellung von Verpackungsmaterialien oder Einwegartikeln.

48

Zusammenfassung

AGR 98/M 206

Nucleinsäuremoleküle codierend Enzyme aus Weizen, die an der Stärkesynthese beteiligt sind

5

10

Es werden Nucleinsäuremoleküle beschrieben, die Enzyme codieren, die an der Stärkesynthese in Pflanzen beteiligt sind. Bei diesen Enzymen handelt es sich um Isoamylasen aus Weizen.

Weiterhin betrifft die Erfindung Vektoren und Wirtszellen, die die beschriebenen Nucleinsäuremoleküle enthalten, insbesondere transformierte Pflanzenzellen und aus diesen regenerierbare Pflanzen, die eine gesteigerte oder verringerte Aktivität der erfundungsgemäßen Isoamylasen aufweisen.